

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO PEPTÍDEOS LIGANTES A SUPERFÍCIE DE  
FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*.

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KELIN GONÇALVES DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO  
PEPTÍDEOS LIGANTES À SUPERFÍCIE DE *Trypanosoma cruzi*.

CURITIBA

2015

KELIN GONÇALVES DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO  
PEPTÍDEOS LIGANTES À SUPERFÍCIE DE *Trypanosoma cruzi*.

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel no curso de graduação em  
Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Co-orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Ferreira de  
Moura

CURITIBA

2015

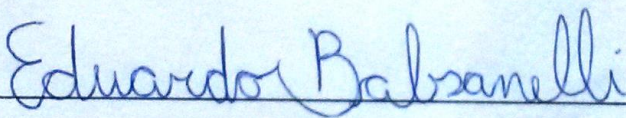
Kelin Gonçalves de Oliveira

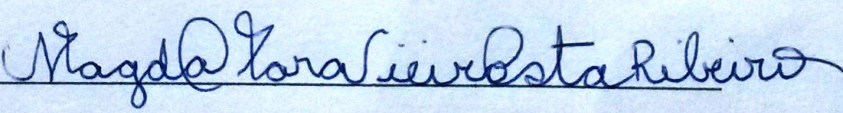
**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO  
PEPTÍDEOS LIGANTES A SUPERFÍCIE DE *Trypanosoma cruzi*.**

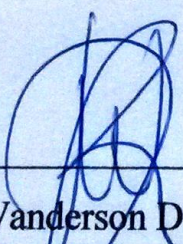
Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel no curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

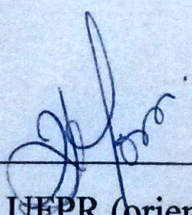
Aprovado em: 16 de 12 de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Eduardo Balsanelli - UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro- UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Wanderson Duarte da Rocha - UFPR (orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Juliana Ferreira de Moura - UFPR (co-orientadora)

## DEDICATÓRIA

*Ao meu avô, Jonas.*

*Constante fonte de inspiração.*



## **AGRADECIMENTOS**

À todo o Laboratório de Genômica Funcional de Parasitos por toda ajuda e companheirismo. O conhecimento e carinho que recebi do grupo me guiarão a me esforçar para ser sempre a melhor versão de mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, por me incentivar e ter sempre muita paciência em direcionar seus alunos, explicar tudo com dedicação, apoiando à todos. Se o tempo voltasse, não hesitaria em tê-lo novamente como orientador.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura por todo auxílio dado durante o desenvolvimento deste trabalho, pela doçura e leveza de ser.

À doutoranda, Normanda Souza de Melo por exercer muito mais que o necessário, assumindo também o papel de co-orientadora inúmeras vezes. Por contagiar a todos com sua alegria até nos dias mais nublados.

Aos meus incríveis amigos. Camila Pasquini de Souza e Franciele Franco Scarante por aguentarem meus melhores e piores momentos de perto, me mostrando que amizades são tão importantes quanto respirar. E Jéssica Frederico Lara e Lyncoln Nellucci Barbosa dos Santos por me incentivarem a distância, por compreenderem minhas ausências e, apesar de tudo, ainda caminharem ao meu lado.

À minha família, por compartilharem todos os momentos desta e de outras jornadas, por serem aqueles aos quais eu anseio pelos dias em que poderemos nos reencontrar. Obrigada por me ensinarem o real significado de amor incondicional.

## RESUMO

A doença de Chagas é uma patologia de ação lenta, progressiva e letal que acomete indivíduos infectados com o parasito *Trypanosoma cruzi*. A infecção ocorre quando os parasitos entram em contato com a corrente sanguínea do mamífero, seu hospedeiro vertebrado, provenientes do inseto barbeiro, o hospedeiro invertebrado. O tratamento da patologia em quaisquer uma de suas duas fases é ainda muito precário e o diagnóstico precoce é difícil de ser realizado, impossibilitando a aplicação do tratamento disponível nas primeiras horas de infecção e permitindo que a doença permaneça ativa em locais endêmicos. Portanto, conhecer mais sobre o parasito e sobre fatores que possam alterar seu ciclo é um ponto chave para a descoberta de novas terapias e ou alternativas de bloqueio do desenvolvimento no hospedeiro invertebrado. Neste contexto, técnicas de identificação de moléculas ligantes, que possam atuar como possíveis inibidores de infecção pelo parasito, como *Phage Display* permitem um rápido screening por peptídeos ligantes. Nesta pesquisa, de um total de 18 clones que codificam peptídeos ligantes em formas tripomastigotas derivadas de cultura de monocamada ou metacíclicas, 8 foram sequenciados e os padrões de peptídeos encontrados sugerem sucesso desta abordagem. A caracterização funcional dos peptídeos é de crucial importância para validação da capacidade de ligação e/ou interferência no desempenho do parasito em seus hospedeiros

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *Phage Display*, peptídeos ligantes.

## ABSTRACT

Chagas' disease is a slow progressing, lethal disease that affects individuals infected with the parasite *Trypanosoma cruzi*. The infection begins when the parasite reaches the blood stream of mammals, its vertebrate host, coming from the kissing bug, the invertebrate host. On both levels of the disease, the treatment is still too poor and early diagnosis is hardly done, which impedes the treatment during the first ours of infection and allows that the disease runs active at endemic areas. Therefore, the knowledge about the parasite and any factor that may alter its life cycle is a key point for discovering new therapies and/or new alternatives to block its development inside the invertebrate host. Within this context, ligands identification techniques, that may act as parasite's inhibitors, such as *Phage Display*, allow a quick screening for ligands peptides. In this research, from a total amount of 18 clones expressing ligand peptides to trypomastigotes from monolayer culture or metacyclic trypomastigotes, 8 were sequenced and the patterns found suggest the success of this approach. Functional peptide characterization is crucial to validate its binding capacity and/or interference in the parasite's performance at its hosts.

**Keywords:** Chagas' Disease, *Trypanosoma cruzi*, *Phage Display*, binding peptides.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	pág 01
2. Revisão da Literatura	
2.1 Doença de Chagas .....	pág 02
2.1.1 O vetor e a morfologia das formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	pág 04
2.1.2 O ciclo de vida do <i>T.cruzi</i> .....	pág 06
2.1.3 Proteínas de membrana estágio-específicas .....	pág 07
2.2. <i>Phage Display</i> .....	pág 08
3. Objetivos	
3.1. Objetivo Geral .....	pág 12
3.2. Objetivos Específicos .....	pág 12
4. Justificativa .....	pág 13
5. Desenho Experimental .....	pág 14
6. Materiais e Métodos	
6.1. Obtenção das Formas Tripomastigotas/Cultivo de Parasito .....	pág 15
6.2. Purificação de Tripomastigotas Metacíclicos .....	pág 15
6.3. Obtenção de Tripomastigotas de Cultivo Celular .....	pág 15
6.4. Fixação com Paraformaldeído .....	pág 16
6.5. Coloração de Giemsa .....	pág 16
6.6. <i>Pannings</i> .....	pág 17
6.7. <i>Dot Blot</i> .....	pág 19
6.8. <i>Western Blot</i> .....	pág 19
6.9. Amplificação por <i>PRC's</i> .....	pág 20
6.10. Purificação do Amplificado .....	pág 21
6.11. Sequenciamento .....	pág 21
6.12. Análise de Resultados .....	pág 22
7. Resultados e Discussão	
7.1. Isolamento de Clones de uma Bilbioteca de <i>Phage Display</i> Reativos com Parasitos Fixados .....	pág 23
7.2. Sequenciamento dos Clones por Reatividade com Formas Tripomastigotas .....	pág 25
8. Perspectivas .....	pág 30



9. Conclusão .....	pág 32
10. Referências .....	pág 33

## 1. INTRODUÇÃO

O ciclo de vida do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é caracterizado por alterações de suas formas celulares, o que compreende mudanças no perfil de expressão das proteínas de membrana. Tais mudanças alteram a capacidade de replicação e sobrevivência do parasito tanto no hospedeiro invertebrado quanto no vertebrado. Portanto, interferir com o balanço de interações celulares entre parasito e hospedeiro à nível proteico pode comprometer o sucesso da infecção permitindo maior controle da infecção. Desta maneira, a técnica de *Phage Display* se mostra crucial para atingir tal objetivo por permitir, por meio de bibliotecas de fagos expressando peptídeos randômicos, a seleção de peptídeos ligantes que tenham uma alta afinidade às proteínas de membrana do tripanossomatídeo nas formas tripomastigota metacíclico e tripomastigota de cultivo celular (passo chamado de *panning* ou *screening*), revelando possíveis padrões de peptídeos ligantes que possam ser utilizados na construção de uma sequência peptídica quimérica que, quando inseridos no triatomíneo, inviabilizem a transmissão do *T. cruzi*.

Neste âmbito, quatro bibliotecas já previamente otimizadas e descritas por Bonnycastle et al (1996) foram utilizadas para a realização dos *pannings*. Tais bibliotecas compreendem diversos padrões de peptídeos que são apresentados monovalentemente nas proteínas maiores de encapsulamento, pVIII, de bacteriófagos filamentosos construídos com vetores do tipo f88. Uma vez selecionados, os fagos tiveram os vetores sequenciados a fim de elucidar quais foram as sequências ligantes. O sequenciamento revelou características interessantes dos fagos que podem guiar novos estudos em terapia humanizada e controle vetorial.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A Doença de Chagas

Também conhecida por Tripanossomíase Americana, a Doença de Chagas (DCh) acomete mamíferos infectados por *Trypanosoma cruzi*, um parasito intracelular obrigatório. A patologia foi descrita primeiramente pelo médico Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (CHAGAS, 1909), que nomeou o agente etiológico em homenagem a Oswaldo Cruz. A via clássica de infecção ocorre quando a fêmea do inseto triatomíneo da família *Reduviidae* (popularmente conhecido por barbeiro), estando infectado com *T. cruzi*, elimina formas tripomastigotas metacíclicas (MT) na pele do mamífero próximo a uma lesão cutânea, geralmente, a causada pela proboscide durante a hematofagia.

A infecção por MT também podem ocorrer no caso de contaminação de alimentos com restos de insetos contaminados. Outras formas de infecção envolvem as formas tripomastigotas sanguíneas (ST), seja por meio de transfusão de sangue (DIAS, 2006) ou doação de órgãos (COURA, 2015), além da amamentação, e a passagem do parasito de mãe para filho durante o parto, a chamada transmissão vertical ou Chagas congênita (CEVALLOS & HÉRNANDEZ, 2014). Casos mais raros de contaminação envolvem acidentes laboratoriais por manipulação errônea de amostras.

A sintomatologia dos pacientes chagásicos pode ocorrer em duas fases da doença: aguda e crônica. Tendo a alta parasitemia na corrente sanguínea como principal característica, a fase aguda ocorre quando há um contato inicial com o protozoário ou em casos de reativação da doença em pacientes chagásicos que já passaram pela fase crônica. Apesar de assintomática na maioria dos casos, a fase aguda pode vir acompanhada de reações mais graves como febre; inflamação dos gânglios linfáticos; mal-estar; inchaço de baço e fígado; edema no local de penetração do parasito, conhecido por chagoma; sinal de Romana (quando a infecção tem a região ocular como porta de entrada); dificuldade em respirar; ou infecções letais no coração, na meninge ou no cérebro (JORGE, 2013). A fase crônica é majoritariamente benigna para 70% dos portadores da DCh e apresenta uma baixa quantidade de parasitos circulantes no sangue, já que a maioria destes se encontra alojado

nos tecidos cardíaco, digestório, e adiposo. Dos pacientes que não apresentam a sintomatologia crônica benigna, dois terços podem desenvolver apenas cardiomiopatias enquanto que um terço destes pode apresentar patologias neurológicas e/ou digestórias concomitante. Devido a destruição progressiva de tecidos, os estágios finais da DCh culminam para morte repentina, geralmente causada por insuficiência cardíaca (WHO, 2015).

O diagnóstico da doença de Chagas, realizado por identificação do parasito na corrente sanguínea periférica do paciente ou por imunodeteção, pode ser feito em qualquer uma das duas fases, empregando-se uma metodologia mais direta para uma detecção na fase aguda ou por meios indiretos quando na fase crônica (CHIARI & GALVÃO, 1997).

Dados epidemiológicos recentes estimam que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas tenham a Tripanossomíase Americana no mundo inteiro e 21 países, majoritariamente localizados na América Latina, têm a doença como endêmica (WHO, 2015) (Figura 1). Apesar de reduzida em relação a 1980, quando havia aproximadamente 20 milhões de infectados, atualmente, a DCh ainda apresenta uma incidência muito alta de 28 mil casos por ano nas regiões endêmicas e se alastra por outros continentes devido ao movimento migratório (STRASEN et al, 2014).

Ainda que seja uma patologia antiga e que atinge um grande número de indivíduos, não existe atualmente uma vacina preventiva ou uma cura devido a limitações biológicas e, também, política. O tratamento disponível atualmente é baseado na tentativa de amenizar os sintomas e eliminar o parasito. Neste último quesito, duas drogas quimioterápicas são amplamente utilizadas – Benzonidazol e Nifurtimox (ALMEIDA, 2013)– e, quando administradas na fase inicial da infecção podem curar completamente, já que eliminam parasitos circulantes, não dando chance para se internalizarem nos tecidos. Apesar de acarretarem muitos efeitos colaterais ao longo do tempo de uso (FERREIRA, 1990), tais quimioterápicos são continuamente utilizados em pacientes de fase crônica, pacientes assintomáticos ou que estejam em reativação da doença, com o objetivo de prevenir o progresso do quadro chagásico (ALMEIDA, 2013).



**Figura 1.** MAPA da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* na América Latina em Setembro de 2014. PAHO, 2014. Escala:1:2000km.

Modificado de: <<http://www.paho.org>>.

### 2.1.1. O vetor e a morfologia das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*

Os barbeiros são insetos hemipteros da família Reduviidae e possuem três gêneros de grande importância médica: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (ARGOLO, 2008).

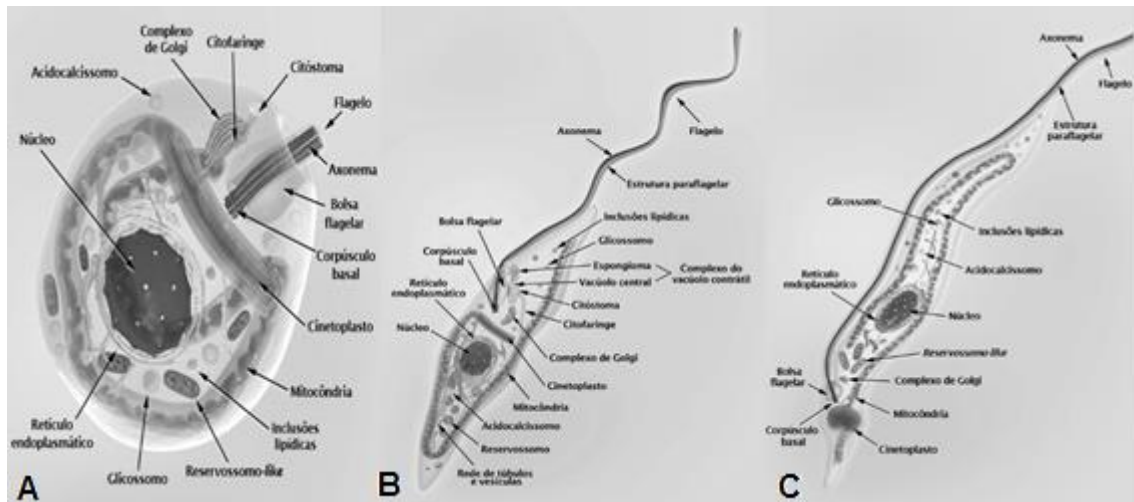
Há mais de 130 espécies amplamente espalhadas pelas Américas, África, Ásia e Austrália (BORGES, 1999; ARGOLO, 2008), mas sete destas são bastante importantes – *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T.*

*brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* – por serem capazes de atuar como vetores exclusivos do *T. cruzi* e se localizarem preferencialmente na América Latina (JORGE & CASTRO, 2000; GALVÃO et al, 2003) onde se abrigam, principalmente, em vãos de casas construídas precariamente ou em entulhos.

Pelo barbeiro se procriar em tais ambientes domésticos deficientes de estrutura básica (além do ambiente selvagem), a DCh apresenta uma endemia destoante nestes locais de menor poder aquisitivo, ficando fortemente associado à fragilidade sanitária e econômica. Tal associação beira problemas políticos que explicam a existência do negligenciamento da doença e a enorme dificuldade em desenvolver melhores métodos de profilaxia, diagnóstico e tratamento (DIAS, 1986; 2007).

Muitos outros motivos justificam esta dificuldade (DIAS, 2007), e um deles se encontra no próprio parasito: o seu ciclo evolutivo. O protozoário apresenta diversas formas celulares que se diferenciam em padrões moleculares superficiais (TEIXEIRA & YOSHIDA, 1986), no posicionamento do cinetoplasto em relação ao núcleo e na posição do flagelo, o que permite que cada forma sobreviva em seu respectivo hospedeiro e exerça suas funções. As amastigotas (Figura 2a) têm como função principal a replicação dentro das células do hospedeiro vertebrado, contribuindo diretamente para a amplificação parasitológica no paciente chagásico (CARVALHO & SOUZA, 1986; TEIXEIRA et al, 2013). Estas têm formas arredondadas, um flagelo curto e discreto, um núcleo avantajado e um cinetoplasto em formato de bastonete que se posiciona entre o pequeno flagelo e o núcleo. As epimastigotas (Figura 2b) também atuam como formas replicativas, mas fazem a multiplicação dentro do intestino do inseto e possuem um formato mais alongado, flagelo aparente e cinetoplasto mais próximo da bolsa flagelar. Depois de um tempo se diferenciando na porção intestinal do triatomíneo, o parasito evolui para o estágio de tripomastigota metacíclico (Figura 2c). Mais afilado e logíneo, de cinetoplasto arredondado e posicionado na extremidade posterior do organismo, os tripomastigotas metacíclicos são as formas que fazem a infecção inicial no hospedeiro vertebrado. Uma vez na corrente sanguínea do mamífero, o parasito precisa se locomover para poder se internalizar em

células e escapar do ataque do sistema imunológico do hospedeiro; para isso, o flagelo é mais evoluído quando comparado com as demais formas evolutivas, pois após emergir da bolsa flagelar, este se adere por toda extensão do parasito e fica livre na extremidade anterior (TEIXEIRA et al, 2013).



**Figura 2.** Principais estágios evolutivos do *Trypanosoma cruzi*. **A.** Amastigotas ou esferomastigotas; **B.** Epimastigotas; **C.** Tripomastigota Metacíclica. Modificado de: TEIXEIRA et al, 2013.

### 2.1.2. Ciclo de vida do *T. cruzi*

Durante o repasto sanguíneo por espécies de triatomíneos em um vertebrado contaminado com *T. cruzi*, o inseto ingere formas circulantes na corrente sanguínea. Quando as tripomastigotas chegam ao estômago do hospedeiro invertebrado, estas se diferenciam tanto em formas amastigotas quanto epimastigotas; estas últimas, uma vez na porção inicial do intestino do inseto, iniciam um rápido processo de multiplicação por fissão binária e se aderem às células intestinais pela extremidade anterior do flagelo. No reto, ocorre a transformação de algumas epimastigotas para a forma infectante, tripomastigota metacíclica, que é eliminado nas fezes do inseto, sobre a pele do hospedeiro vertebrado utilizado para a alimentação sanguínea. Em contato com o mamífero, os parasitos entram nas células, seja por ação mecânica ou endocitose. Um vacúolo parasitóforo é formado ao redor do tripanossomatídeo; estrutura que será dissolvida devido à liberação enzimática do parasito. Ainda dentro do vacúolo, o protozoário vai assumindo a forma de amastigota que,



uma vez liberada do vacúolo, se multiplicará por fissão binária até preencher boa parte do citoplasma. Estas irão, por sua vez, se diferenciar em tripomastigotas, romper a célula e cair no espaço extracelular para invadir novas células e repetir o processo (SOUZA, 2002; BRENER, 1997).

### **2.1.3. Proteínas de membrana estágio-específicas**

Dentre diversos pacientes infectados, uma grande variedade de gravidade e sintomas pode ser encontrada. Apesar da influência da variabilidade do hospedeiro na interação parasito-hospedeiro, trabalhos reforçam a contribuição atribuída a variabilidade entre as cepas nesta dinâmica (YOSHIDA, 1983).

Por exemplo, foi observado que algumas cepas tendem a produzir um quadro patológico mais brando em camundongos – como é o caso da cepa G – cujo diagnóstico só pode ser confirmado positivo por exames indiretos do tipo xenodiagnóstico devido à baixa parasitemia produzida, enquanto que outras cepas – como a CL Brener e Y – apresentam virulência e parasitemia consideravelmente maiores (YOSHIDA, 1983).

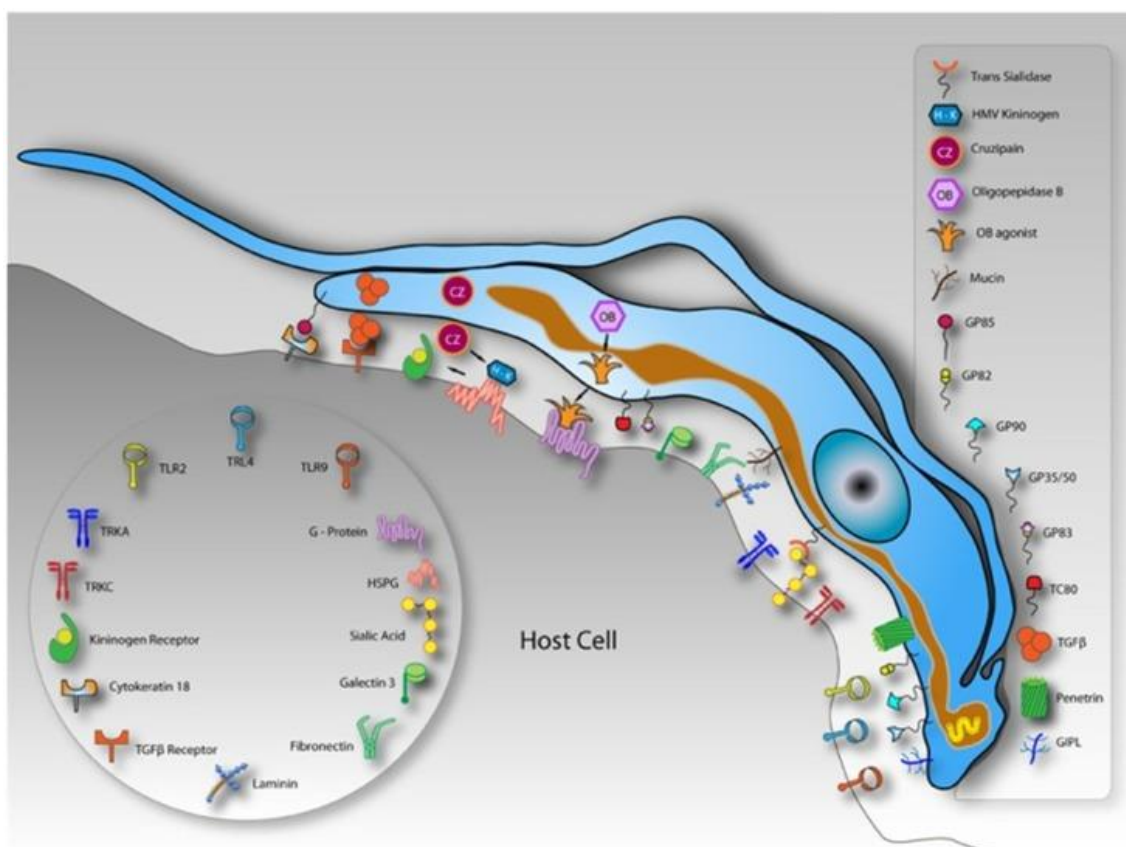
Além da virulência, os parasitos também necessitam realizar diversos outros processos (sobrevivência, aderência e inserção às células dos seus hospedeiros) que dependem da presença de glicoproteínas de membrana com padrões variáveis a fim de interagir com o meio de forma adequada. Portanto podemos inferir que: uma função diferente vem seguida de estrutura diferente que sustenta as funções do parasito.

Devido a essa alta necessidade de adaptação, *T. cruzi* apresenta diversas famílias de proteínas de superfície (Figura 3), tais como: gp63, gp85/transcinalidase, mucinas, gp35, gp50, gp82, gp90, gp160 e proteínas de superfície associadas a mucinas, por exemplo, que contribuem na coordenação dos processos moleculares necessários para a ativação corretas das cascatas de sinalização (TEIXEIRA & YOSHIDA, 1986; YOSHIDA et al, 1989; RUIZ et al, 1993; QUEIROZ, 2013).

Neste quesito, muitas proteínas específicas de tripomastigotas metacíclicas são de interesse em estudos como este que visam comprometer a capacidade de infecção destas formas evolutivas, prejudicando o

funcionamento natural de proteínas como, por exemplo, gp82 que, quando atrelada à uma molécula desconhecida, culmina na liberação do cálcio presente no retículo endoplasmático (QUEIROZ, 2013); as glicoproteínas de 35, 50 e 90kDa que, quando neutralizadas com anticorpos específicos, impedem a internalização do parasito (RUIZ, 1993; YOSHIDA, 1989); a gp82 que apresenta importante papel na infecção oral (CORTEZ, 2014); a gp160 que restringe a ativação do sistema complemento do hospedeiro (NORRIS, 1991), bem como muitas outras proteínas que possam atuar de maneira essencial nas formas infectantes (BARRIAS et al, 2013).

Tais proteínas de membrana de tripomastigotas de *T.cruzi* que desencadeiam processos muito importantes podem servir de sítio de ligação para peptídeos selecionados, a fim de alterar sua função e impedir a continuação do ciclo do parasito.



**Figura 3.** Modelo esquemático apresentando algumas das proteínas do parasito e da célula hospedeira que participam da interação entre estes. Obtido de BARRIAS et al, 2013.

## 2.2. *Phage Display*

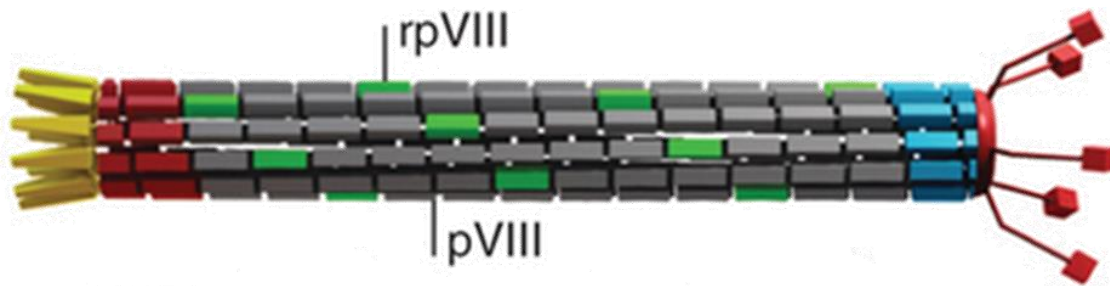
Encontrar ligantes de proteínas de membrana que interfiram na

interação parasito-hospedeiro é um objetivo que pode ser alcançado por meio de vários métodos. Técnicas como *F.R.E.T. (Fluorescence Resonance Energy Transfer)* (HELD, 2012), biotilação (INGARAMA & BECKETT, 2011), co-imunoprecipitação (GOLEMIS, 2002), *Phage Display* com bibliotecas de anticorpos (SMITH et al, 2005) ou peptídeos (BONNYCASTLE, 1996), e ressonância magnética nuclear (FIGUEIREDO & MARSAIOLI, 2007) são algumas das metodologias que podem ser aplicadas, mas que apresentam requerimentos específicos.

No entanto, quando se deseja obter um produto ligante final de tamanho reduzido, onde seja possível ter conhecimento também da sequência codificadora de tal ligante, bem como ser capaz de amplificá-lo utilizando bactérias, a técnica de *Phage Display* se destaca.

Primeiramente descrita em 1985 por George P. Smith (SMITH, 1985) e George Pieczenikv, o *Phage Display* se mostrou de grande valia para a elucidação de interações entre proteína-proteína e proteína-DNA.

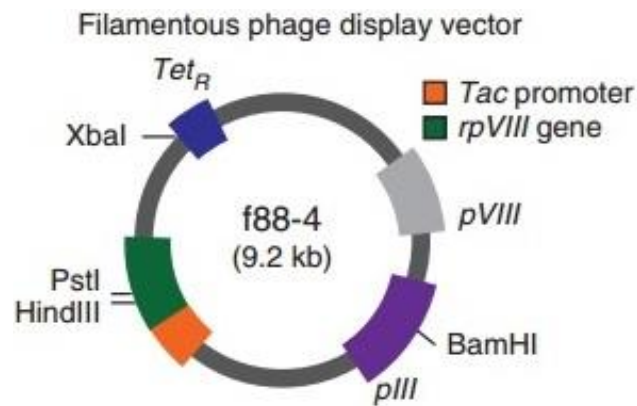
Bacteriófagos, como o próprio nome indica, são vírus (fagos) que têm a capacidade de infectar células bacteriais, geralmente *E.coli*, usando a maquinaria desta para produzir suas próprias proteínas (SCOTT & SMITH, 1990). Na técnica de *Phage Display*, tal maquinaria é utilizada para produzir uma sequência peptídica de interesse acoplada às proteínas de encapsulamento de fago filamentoso, ficando exposta na superfície do vírion a fim de interagir com moléculas presentes no meio externo. Isso ocorre, pois a ligação entre peptídeos de interesse e proteína de encapsulamento é realizada a nível do DNA. O genoma do fago é utilizado como um vetor de expressão por aceitar segmentos de DNA estranho em sua própria sequência (SMITH & PETRENKO, 1997). Portanto, por meio de técnicas moleculares, a região codificadora do peptídeo é colocada após a região que codifica as proteínas de superfície (gene 3, 8 ou 6, na maioria dos casos), e, quando a proteína de encapsulamento for produzida, os peptídeos também serão, gerando um proteína híbrida-fusionada (Figura 4). Uma das grandes vantagens da técnica é a baixa interferência que o fusionamento causa tanto no funcionamento do fago quanto na afinidade e especificidade do peptídeo expresso (SMITH et al, 2005; SMITH & PETRENKO, 1997).



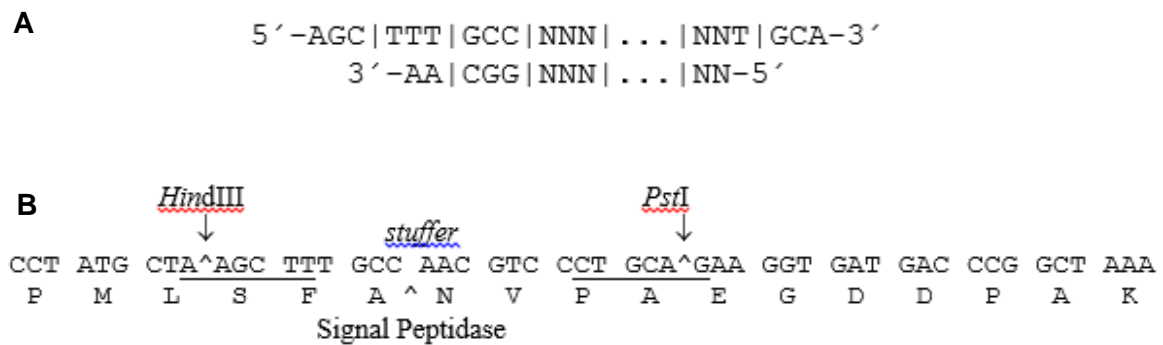
**Figura 4.** Estrutura básica das proteínas de encapsulamento dos bacteriófagos: pVIII selvagem é mostrada em cinza e pVIII recombinante (híbrida) para que apresente o peptídeo, se apresenta em coloração verde. Modificado de: RANGEL et al , 2013.

Misturas heterogêneas de fagos expressando diferentes peptídeos na superfície constituem uma biblioteca de *Phage Display* que podem ser usadas para testar diversos padrões peptídicos contra um antígeno. Esta seleção é realizada por meio de *pannings* (também chamados de *screenings*) onde um determinado antígeno, aderido à parede de uma placa de ELISA ou suspenso em solução, é exposto a bibliotecas de fagos. Vírions que apresentarem peptídeos com maior afinidade pelo antígeno testado serão mantidos enquanto que aqueles que não ligaram ou aderiram fracamente, serão eluídos em passos de lavagens. A seleção de fagos de altíssima afinidade é realizada pela repetição do *screening*, utilizando apenas o *pool* de fagos ligantes devido à maior competição por sítios de ligação (LOWMAN et al, 1991).

Dentre diversos tipos de vetores utilizados para o *Phage Display*, este estudo utilizará fagos contendo vetores do tipo f-88.4 (Figura 5) (GenBank AF218363), que são otimizados por terem duas cópias do gene VIII; uma cópia produz a proteína de encapsulamento VIII fusionada à sequência peptídica na porção N-terminal (Figura 6A), que pode ser inserida por meio de sítios de restrição – *HindIII* e *PstI* – estrategicamente adicionados (Figura 6B), enquanto que a outra cópia do gene, não homóloga, está em sua forma selvagem (WT) e, portanto, não terá nada acoplado a si. A presença de proteínas fusionadas e WT permite que, apesar da baixa abundância, sequências peptídicas maiores sejam expostas na superfície (BONNYCASTLE, 1996; SMITH, 2006; WEISSLEDER et al, 2010). A amplificação dos vírions selecionados pode ser feita por meio de infecção de *E.coli* K91, que é a cepa mais indicada para amplificação de bibliotecas de fagos do tipo f88 (BONNYCASTLE, 1996).



**Figura 5.** Estrutura do vetor de fagos f88.4. O gene VIII selvagem é mostrado em cinza enquanto que o gene VIII recombinante está em verde, juntamente com seus dois sítios de restrição e após o promotor Tac. Modificado de: RANGEL et al , 2013.



**Figura 6. A** – Sequência consenso dos peptídeos que têm maiores chances de serem inseridos com sucesso. **B** – Local de inserção da sequência peptídica de interesse está entre os sítios de restrição HindIII e PstI. O inserto pode ser colocado após a retirada do *stuffer* (enchimento).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Identificar polipeptídeos provenientes de quatro bibliotecas de bacteriófagos com afinidade à superfície de tripomastigotas metacíclicos e derivados de cultivo.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Selecionar fagos expressando peptídeos com alta afinidade às proteínas de membrana de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizando bibliotecas de *phage display*;
- Analisar *in silico* as sequências dos peptídeos identificados por sequenciamento do DNA dos fagos.

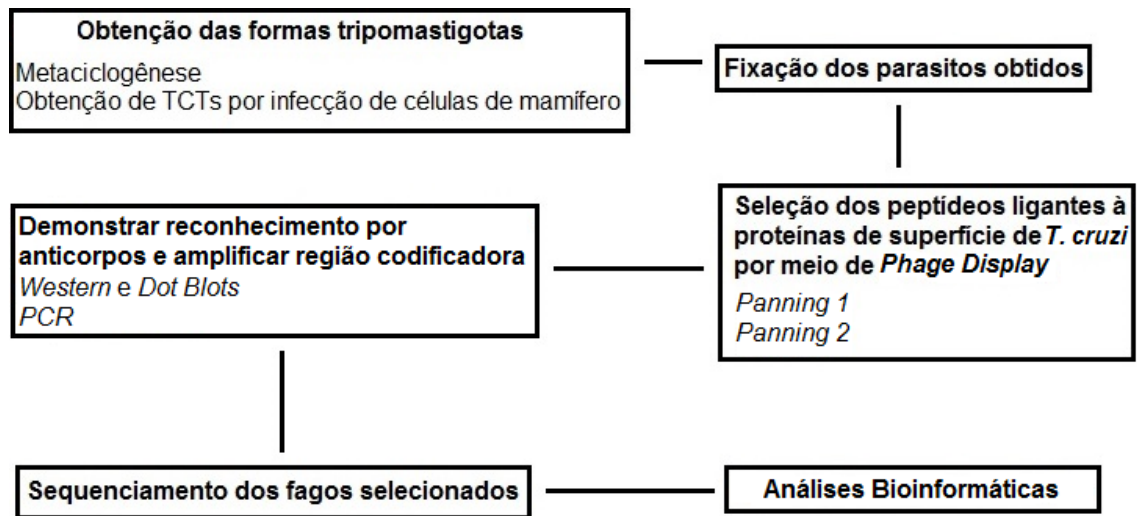
#### 4. JUSTIFICATIVA

Em 2001, Ghosh e colaboradores observaram, trabalhando com *Plasmodium*, que por meio de *Phage Display*, era possível destacar um peptídeo de 12 aminoácidos (SM1) ligante a regiões específicas participantes da interação parasito-hospedeiro no mosquito vetor. Quando em experimentos de infecção, os resultados demonstraram que o peptídeo SM1 inibia com sucesso a invasão do *Plasmodium* nos tecidos do hospedeiro. Com este conhecimento, novas possibilidades surgiram no estudo de manipulações genéticas vetoriais capazes de reduzir a disseminação deste parasito.

Neste contexto, visa-se utilizar abordagem semelhante aplicando esta metodologia para o *T. cruzi*. Conhecer um pouco mais sobre possíveis padrões de peptídeos ligantes à membrana das formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* pode ajudar a direcionar esforços não apenas no tratamento e diagnóstico da DCh, mas também na profilaxia. Além do mais, tais ligantes poderão ser otimizados para protocolos de purificação destas formas em amostras biológicas.



## 5. DESENHO EXPERIMENTAL



## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1. Obtenção das formas tripomastigotas / cultivo de parasitos**

As formas tripomastigotas metacíclicas (TM) foram obtidas por meio de tripomastigogênese.

Uma cultura de  $1 \times 10^7$  epimastigotas por mL foi crescida a 28 °C por 3 dias em um pré inóculo contendo 3 mL de meio LIT, tendo o volume aumentado para 10 mL após este período. Os parasitos ficaram crescendo nas mesmas condições por cinco dias ou até atingirem a densidade celular entre 5 e  $7 \times 10^7$  parasitos/mL. Em seguida, foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos a 10 °C e ressuspensos em 1 mL de meio TAU (NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl 2 mM, tampão fosfato 8 mM pH 6,0), onde ficaram incubados por 2 horas a 28 °C. A cultura de parasitos em TAU foi adicionada a 99 mL de meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM), e permaneceu a 28 °C por 7 dias para que os protozoários se diferenciasssem em tripomastigotas.

### **6.2. Purificação de tripomastigotas metacíclicos**

Após o cultivo, a cultura foi purificada em coluna de cromatografia de troca iônica para a obtenção de uma cultura pura de tripomastigotas metacíclicos.

A coluna utilizada, de DEAE-Celulose, é uma matriz aniônica que contém grupos dietilaminoetil, sendo positivamente carregadas em pH neutro, o que irá reter as formas não diferenciadas e eluir apenas os parasitos de interesse.

A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna (CV) de tampão PBSG 2% e, na última calibração, a cultura de tripomastigotas foi centrifugada (5000 rpm / 3 min / 4 °C) e ressuspensa em 1 mL de PBSG 2%. Este volume de solução tampão com parasito foi adicionado na coluna, seguido de 1 CV de PBSG 2%, concomitante a coleta do eluato.

### **6.3. Obtenção de Tripomastigotas de Tecido Celular**

As formas tripomastigotas provenientes de tecido celular (TCTs) foram obtidas através de infecção de células de mamíferos LLC-MK2 (célula epitelial

de rim de macaco rhesus). Uma quantidade de  $2 \times 10^6$  células foi repicada em garrafas de 170 cm<sup>2</sup> por 24 horas antes da infecção em meio RPMI suplementados com 5% de soro fetal bovino em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Depois de aderidas, as mesmas foram infectadas com  $1 \times 10^8$  tripomastigotas metacíclicas obtidas por diferenciação em 7 dias em meio TAU3AAG (conforme item 4.1.) sem purificação.

As células infectadas ficaram incubadas com estes TM por 24 horas e, posteriormente, o meio foi trocado e a garrafa foi submetida a uma lavagem com meio RPMI sem adição de soro. A esta mesma garrafa adicionou-se meio RPMI suplementado com 10% de soro de cavalo por 24 horas com o intuito de remover as formas epimastigotas pela ação das enzimas do sistema complemento presentes no soro. Após este período, a garrafa passou por uma nova lavagem com RPMI sem soro e, logo após, foi adicionado meio RPMI com 5% de soro fetal bovino.

As lavagens e adição de meio suplementado com 5% de soro fetal bovino foram realizadas por 11 dias consecutivos, que é o tempo para a liberação das formas TCTs.

#### **6.4. Fixação com Paraformaldeído**

Depois de obtidos, os protozoários foram fixados com paraformaldeído 2% (PFA). Para isso, as soluções de parasitos, tanto MT quanto TCT, foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso em 600 µL de PBS e acrescentou-se, em seguida, mais 600 µL de PFA 4% (concentração final de PFA na solução = 2%) que reagiu por 3 minutos. Uma nova centrifugação (9000 rpm / 5 minutos) foi realizada a fim de precipitar os parasitos fixados. O *pellet*, após ter sido lavado uma vez com tampão TBE 1X, foi centrifugado novamente.

#### **6.5. Coloração de Giemsa**

Para a verificação de que apenas amostras puras de parasitos tripomastigotas foram utilizadas, foi realizada a coloração de Giemsa (FERNANDES et al, 2013). Para isso, 200 µL de solução de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL foi centrifugada a 7000 rpm por 5 minutos, tendo 150 µL do

sobrenadante descartado e o pellet ressuspensão nos 50 µL restantes. Desta suspensão, 10 µL foi gotejado e espalhado em uma lamínula redonda de vidro, onde ficou secando por 20 minutos a 37°C.

Metanol gelado foi adicionado até cobrir a lamínula, ficando em contato com esta por 30 minutos, seguido de 2 lavagens com água. A solução de Giemsa foi então adicionada, ficando 40 minutos em reação. Em seguida, as lamínulas foram lavadas até não se observar a coloração azul residual presente na água de lavagem, seguindo para a secagem e montagem da lâmina com meio de montagem rápido - Entellan®. Após montada, a lâmina foi escaneada e fotografada.

### **6.6. Pannings**

Os *pannings* foram conduzidos com os seguintes componentes:

- $1 \times 10^7$  parasitos/mL (Tripomastigotas TCT ou MT)
- 15% de BSA 1mg/mL
- $5 \times 10^3$  fagos/parasito
- TBST 0,05% q.s.p. 1mL

A solução permaneceu por 16 horas a 4 °C. No dia seguinte, a amostra foi colocada sob agitação leve (70 rpm) em temperatura ambiente por 2 horas. Logo após, a solução passou por uma centrifugação na velocidade de 9000 rpm durante 5 minutos à temperatura de 4 °C, tendo o sobrenadante descartado. Para retirar os fagos não ligantes, 15 lavagens foram realizadas. Cada lavagem consistiu em colocar 1 mL de tampão TBST 0,05%, homogeneizar o *pellet* por inversão, centrifugar a 9000 rpm por 5 minutos à 4 °C e descartar o sobrenadante por pipetagem.

Ainda, mais quatro lavagens foram feitas utilizando tampão Glicina-HCl. Após adição do tampão ácido, a amostra ficou em agitação baixa de 70 rpm durante 3 minutos, sendo centrifugada posteriormente.

A eluição dos fagos fortemente ligados foi realizada, também, com a adição de tampão Glicina-HCl incubado com a amostra por meia hora em agitação de 70 rpm e temperatura ambiente, seguido de centrifugação (9000 rpm / 4 °C / 5 min). Desta vez, o sobrenadante foi transferido de tubo e ajustado para pH 7,0 com o tampão de neutralização (Tris HCl 2M pH 9,0). A

solução neutralizada contendo o *pool* inicial de fagos ligantes foi alíquotada (alíquota parcial) em 100 µL para posterior titulação e o restante da solução passou por amplificação em *E.coli*.

Um pré inóculo de células *E.coli* K91 foi preparado no dia anterior adicionando uma colônia de K91 em 10 mL de meio Lúria Bertani (LB) (que deve ficar em agitação de 225 rpm à 37 °C durante 16 horas), e deste foi preparado um inóculo (10 mL do pré inóculo em 100 mL de LB) que ficou em agitação de 225 rpm/37 °C durante 4 horas ou até atingir densidade óptica de 0.8 em 550 nm. Posteriormente, o inóculo ficou sob agitação de 50 rpm/37 °C durante meia hora para o crescimento do pilli celular.

Os fagos eluídos foram colocados juntamente com as células crescidas, mantendo a proporção de 1.7 mL de inóculo para cada 1 mL de solução de fagos. A solução de amplificação permaneceu sem agitação (37 °C) durante meia hora; após receber 2% de tetraciclina, o recipiente ficou no agitador por meia hora a 225 rpm / 37 °C. A concentração de antibiótico foi ajustada para 20 mg/mL e a solução permaneceu no agitador (225 rpm / 37 °C) durante 16 horas.

O volume total foi centrifugado (4000 rpm / 4 °C / 20 min) para precipitar as células. O sobrenadante, depois de transferido para um novo recipiente, recebeu 15% de polietilenoglicol (PEG) e, depois de homogeneizado, ficou no gelo, na geladeira, por 16 horas.

Por fim, para obter uma solução amplificada de fagos, a solução com PEG foi centrifugada a 8000 rpm / 4 °C durante uma hora. O *pellet*, ressuspenso em 3 mL de tampão TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0), foi incubado à 37 °C durante meia hora sob rotação de 150 rpm. Uma centrifugação com rotação maior (15000 rpm / 10 min) em temperatura ambiente foi realizada, afim de retirar o restante celular. O sobrenadante foi trocado de tubo e uma alíquota (final) de 100 µL foi retirada para posterior titulação. O restante foi mantido a -20 °C até a realização do próximo *panning*.

A fim de saber a concentração de fagos obtidos, ambas as alíquotas (final e parcial) obtidas no *panning* foram tituladas em placa de petri com meio LB com ágar contendo 20 mg/mL de tetraciclina. Foram preparadas diversas diluições de cada alíquota. Para a parcial, as diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$

foram feitas, enquanto que para as alíquotas finais, as diluições realizadas foram:  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$ .

Para chegar ao valor de concentração de fagos de cada diluição, a seguinte fórmula foi aplicada:

$$\text{TU/mL} = \text{número de colônias contadas na placa} \times \text{fator de diluição} \times 100,$$

onde TU/mL se refere à quantidade de fagos por mililitro.

As colônias obtidas nas placas referentes às alíquotas parciais foram inoculadas em um pré inóculo pequeno de 150  $\mu\text{L}$  de meio LB contendo 20 mg/mL de tetraciclina durante 16 horas (a 225 rpm e 37 °C) e foram, após este período, centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos. O *pellet*, ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de meio LB e tendo 10  $\mu\text{L}$  de Glicerol 50% adicionado, foi levado ao freezer -20 °C para que a amostra fique preservada.

### 6.7. Dot Blot

A fim de detectar a eficiência dos anticorpos utilizados para confirmar a presença de fagos ligantes, quantidades diferentes de parasitos foram aderidos em *spots* na membrana de nitrocelulose que foi, após bloqueio com leite em pó 5%, incubada por duas horas com uma solução de  $5 \times 10^{10}$  fagos diluídos em 30 mL de PBS Tween 0,05%. Após lavagens com PBS tween 0,05%, a membrana foi incubada por uma hora com anticorpos (anti-fago HRP ou anti-fago M13 conjugado a peroxidase), sendo posteriormente revelada em papel filme.

### 6.8. Western Blot

Géis de SDS-PAGE 12% foram corridos sob voltagem de 200 V por duas horas e meia, aproximadamente, e transferidos para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se um sistema de transferência semi-seco que fará a transferência sob voltagem de 80 V durante 1 h 20 m. O bloqueio da membrana foi feito com solução de lavagem (PBS Tween 0,05%) complementada com 5% de leite em pó e os anticorpos (diluídos em solução de lavagem) foram incubados com a membrana durante uma hora, sempre sob agitação leve e em temperatura ambiente. Entre cada passo, a membrana foi lavada 4X de 5 minutos com solução de lavagem.

A revelação do *western blot* foi realizada tanto por revelação em papel

filme quanto por coloração com DAB-Naftol a fim de demonstrar a especificidade dos anti-fagos utilizados em reagir de modo cruzado com o extrato dos parasitos..

### 6.9. Amplificação por PCR's

Bactérias estocadas em glicerol após a titulação parcial realizada nos *pannings*, foram utilizadas no método de amplificação pela reação em cadeia de polimerase (PCR), a fim de obter as regiões codificadoras do vetor de cada clone de bacteriófago. Para isso, cada clone foi inoculado em 3 mL de meio LB e ficou em agitação sob temperatura de 37°C durante 16 horas e, plaqueados em seguida em *spots* em uma placa de petri com meio LA suplementado com tetraciclina 20 mg/mL que ficou na estufa 37°C por 16 horas. Após crescimento das colônias, o DNA destas foi coletado para realização da amplificação.

Os *primers* utilizados foram (Tabela 1):

- Hindp-F88.4\_For(forward) ou F88.4\_1\_sFor

-Zhong-F88.4\_Rev (ZHONG et al, 1994) ou Claude-F88.4\_Rev (FERRIÈRES et al, 2000)

**Tabela 1** – Sequência dos *primers* utilizado para amplificação por PCR e/ou sequenciamento

Nome	Sequência (5' – 3')
<b>F88.4_1_For</b>	CCTTTAATCGGCCTCCTGTT
<b>Hindp-F88.4_For</b>	GCGACTCTTGTTCTATGCTAAGC
<b>Claude-F88.4_Rev</b>	TCGGCAAGCTCTTTTAGG
<b>Zhong-F88.4_Rev</b>	AGTAGCAGAAGCCTGAAGA

Para o mix de PCR, utilizou-se o Kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos - Mistura de PCR 3X e os *primers* Hindp-F88.4\_For ou F88.4\_1\_For combinado com o *primer* reverso Claude-F88.4\_Rev ou Zhong-F88.4\_Rev.

Cinquenta microlitros do mix foi aliquotado em cada tubo de reação, sendo adicionado o dna das colônias posteriormente. A reação consistiu de 25 ciclos, sob temperatura de anelamento igual a 52°C e 1m30s de tempo de extensão.



#### **6.10. Purificação do Amplificado**

O produto de amplificação foi corrido em pequena quantidade (3  $\mu$ L) em gel de agarose 1.2% a 80V por uma hora, para verificar tanto a eficiência quanto o funcionamento da reação de PCR. Em seguida, as amostras válidas tiveram todo o seu conteúdo corrido em gel de agarose 1,2%, para realizar purificação de DNA em banda de gel com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare) (VOGELSTEIN, 1979; MARKO, 1982). O purificado foi eluído em água estéril livre de nucleases, sendo esta a condição mais ideal para estocar a amostra a ser sequenciada.

#### **6.11. Sequenciamento**

Os fagos selecionados foram sequenciados através do método de Sanger, a fim de elucidar quais insertos presentes nos vetores dos bacteriófagos ligantes têm maior potencial de ligação, podendo ser utilizados para análise *in silico*.

As reações de sequenciamento foram realizadas em volumes de 10 $\mu$ L /cada, consistindo de 0,5  $\mu$ L de *primer* Zhong-F88.4\_Rev a 10 $\mu$ M, 1  $\mu$ L de tampão *Big Dye*, 2,5  $\mu$ L de tampão *Save Money*, 3  $\mu$ L de DNA (100 ng); e água MiliQ estéril q.s.p. 10  $\mu$ L.

Os DNAs sequenciados foram colocados para amplificar numa reação com os seguintes tempos e temperaturas:

- 96°C por 1 minuto; 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 54°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após o procedimento realizado acima, as amostras foram purificadas. Na purificação, foram adicionados sob a reação de sequenciamento: 10  $\mu$ L de água MiliQ estéril, 2  $\mu$ L de Acetato de Amônio 7,5M, 66  $\mu$ L de Etanol 99,5%. A mistura ficou em temperatura de -20°C durante 20 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 14000rpm durante meia hora. O sobrenadante foi descartado por inversão até ficar o mínimo possível de remanescente no tubo. Cem microlitros de etanol 70% foi adicionado a cada tubo, seguido de outra centrifugação sob mesma rotação que a anterior durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras seguiram para leitura no sequenciador.

#### **6.12. Análise de Resultados**

Os dados obtidos dos sequenciamentos foram analisados por meio de ferramentas bioinformáticas, como ExPASy, BLAST e Clustal Omega. Os *pannings* foram avaliados também quanto a qualidade conforme a estabilidade da quantidade de fagos obtidos e amplificados.

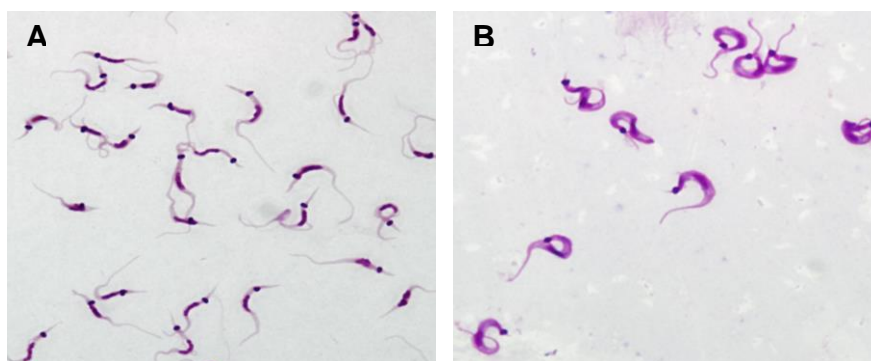
## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1. Isolamento de clones de uma biblioteca de *Phage Display* reativos com parasitos fixados

Depois da padronização do procedimento de *Phage Display* em formas epimastigotas, as formas tripomastigotas foram cultivadas com sucesso, sendo utilizadas suspensões puras destas para a realização dos procedimentos da técnica (Figura 7). Na figura supracitada é possível verificar que os parasitos apresentam morfologia esperada e não têm agregação. Optou-se por utilizar parasitos fixados para evitar a manipulação de formas infectivas vivas.

Utilizando-se os parasitos fixados, foram realizados 2 *pannings*, a fim de obter uma menor diversidade de peptídeos. Em cada etapa de seleção,  $1 \times 10^7$  parasitos tripomastigotas foram incubados com  $5 \times 10^{10}$  fagos. Nesses procedimentos, os dados de titulação apontaram uma eficiência de  $1 \times 10^4$  a  $6 \times 10^5$  fagos (TU/mL) como mostrado na Tabela 2.

Observa-se também que a quantidade final de bacteriófagos se manteve relativamente estável (uma média de  $3 \times 10^5$  TU/mL recuperados para metacíclicos e  $1,95 \times 10^4$  TU/mL para TCTs) entre os *rounds* 1 e 2, sugerindo que estes valores indicam uma saturação dos locais disponíveis para ligação na membrana do parasito. Nos próximos passos, os eluatos de bacteriófagos foram amplificados em *E.coli* de 1 até  $2 \times 10^{12}$  TU/mL.

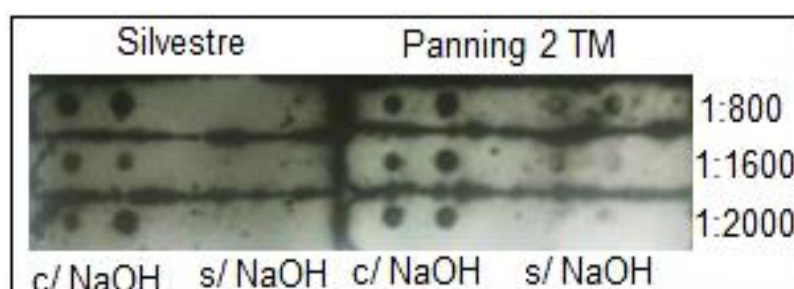


**Figura 7.** Coloração das suspensões puras de formas tripomastigotas metacíclicas (A) e tripomastigotas de cultivo celular (B) utilizadas para a realização dos *pannings* (Giemsa 100X) .

**Tabela 2.** Concentração de fagos recuperados dos *pannings* realizados tanto com parasitos tripomastigotas metacíclicos (MT) quanto com tripomastigotas derivadas de cultivo tecidual (TCT).

	MT	TCT
<b>Panning 1</b>	$3,3 \times 10^4$ (TU/mL)	$2,9 \times 10^4$ (TU/mL)
<b>Panning 2</b>	$6,0 \times 10^5$ (TU/mL)	$1,0 \times 10^4$ (TU/mL)

Com o intuito de avaliar capacidade de ligação, e a eficiência de ligação dos diferentes clones de fagos isolados, a capacidade de ligação dos fagos foram testadas por *western blot* e *dot blot*. Estes testes permitem triagem de clones expressando peptídeos com melhor reconhecimento do parasito, uma vez que ensaios de ELISA não são aplicáveis para teste de parasitos fixados. Após diversas tentativas, os testes dos ensaios de *dot blot* com anticorpos anti-fago, tanto com fagos silvestres (que não apresentam a sequência peptídica conjugada a suas proteínas de encapsulamento) quanto fagos recuperados do segundo *panning* contra MT, foram bem sucedidos quando utilizou-se o anti-fago HRP, que é diretamente conjugado à peroxidase (Figura 8). No entanto, tal anticorpo não permitiu detecção de fagos em suspensões de parasitos incubados com fago, em ensaios de *western blot*, ou em ensaios de imunofluorescência. Estes ensaios apontam uma forte reação cruzada com o extrato proteico do parasito por parte dos anticorpos secundários (anti-IgG de coelho, por exemplo). Sendo assim, optou-se por sequenciamento aleatório dos clones enriquecidos no segundo *panning*.

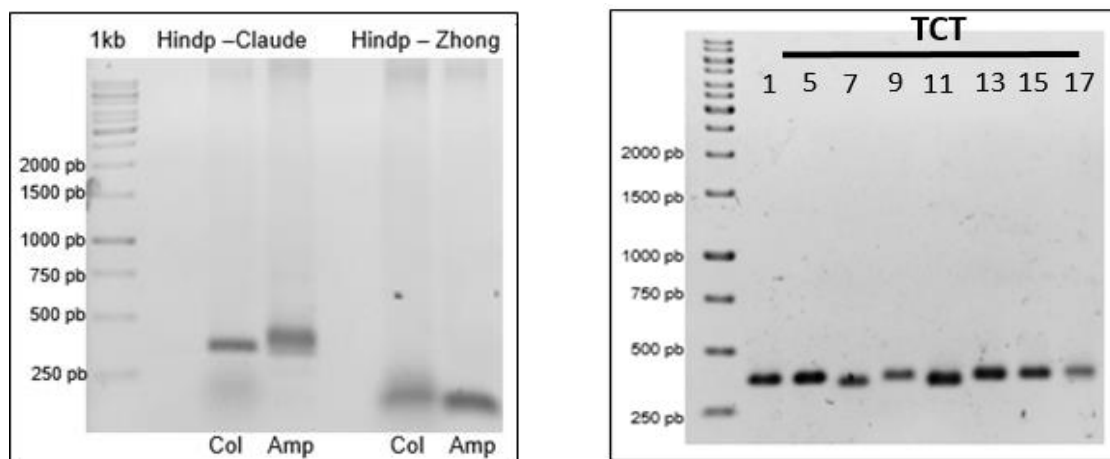


**Figura 8.** Dot blot –  $1 \times 10^{10}$  TU/mL colocados sob a membrana de nitrocelulose demonstraram ter um reconhecimento melhor quando os fagos se apresentam na forma desnaturada (com NaOH 0,02M) para as duas amostras, mas é possível observar reconhecimento dos fagos recuperados no segundo *panning* de TM.

## 7.2. Sequenciamento dos clones com reatividade com formas tripomastigotas.

Diante do grande número de fagos estimado nas titulações pré-amplificação dos fagos, e o interesse em evitar purificações de DNA do fago filamentososo F88.4 (DNA circular fita simples) optou-se por realizar reações de PCR utilizando primers previamente descritos na literatura (Claude-F88.4\_Rev ou Zhong-F88.4\_Rev) ou desenhado nesse trabalho (Hindp-F88.4\_For). O par de *primers* Hindp-F88.4\_For e Claude-F88.4\_Rev permite a amplificação de um fragmento de ~330 pb e Hindp-F88.4\_For e Zhong-F88.4\_Rev um fragmento de 96 pb (desconsiderando-se os tamanhos dos insertos referentes aos peptídeos), como pode ser visto na Figura 9A.

Ambos os pares de *primers* funcionaram para amplificar tanto DNA de interesse, a partir do DNA da colônia crescida em placa contendo antibiótico, quanto da suspensão de fagos amplificados. Desta forma, optou-se por realizar as PCRs com o par Hindp-F88.4\_For e Claude-F88.4\_Rev, utilizando DNA proveniente de colônias, sequenciando os produtos de PCR com o primer Zhong-F88.4\_Rev (*nested primer*).



**Figura 9. A** - Produtos de PCR corridos em gel de agarose 1,2%. Cada par de *primers* foi testado em amplificações com DNAs provenientes de duas fontes diferentes. Col – DNA vindo de colônia de *E.coli* infectada. Amp – DNA vindo da solução de fagos amplificados. **B** – Diversidade de tamanhos entre os diferentes clones amplificados (utilizando par de *primers* Hindp – Claude).

Das colônias obtidas na titulação dos fagos pré amplificação, oito clones positivos com *screening* com TCTs e oito de MT foram escolhidos para

seguirem para sequenciamento. Nestas 16 amostras, observa-se variações de tamanho sutis quando em gel de agarose 1,2%, sugerindo presença de diversidade entre os fagos selecionados (Figura 9B). A presença de tal variação é interessante por permitir identificação de fagos expressando peptídeos em diferentes formatos.

Os dados de sequenciamento dos fagos utilizando o *primer* Zhong-F88.4\_Rev identificou sequências de nucleotídeos codificadora de polipeptídeos de tamanhos variáveis. Estes dados são compatíveis com a diversidade sugerida na interpretação da figura 9B. O alinhamento múltiplo destas sequências, utilizando Clustal Omega, demonstrou que, apesar da diversidade, algumas das sequências apresentam um nível de conservação entre si (Tabela 3). Nos sequenciamentos provenientes de amostras de fagos recuperados dos *pannings* realizados com TCTs por exemplo, de sete amostras sequenciadas, três se apresentaram idênticas, indicando que apesar da complexidade da membrana do parasito devido a presença de diversas biomoléculas, um mesmo clone se repetiu três vezes. Ainda neste grupo amostral, outras duas sequências apresentaram cerca de 86% de identidade (Figura 10), o que indica que dos 15 aminoácidos codificado pelo fago 11 podem ser cruciais para interação com a superfície do parasito. Os outros dois clones apresentam sequências distintas.

**Tabela 3.** Características dos clones identificados por afinidade com tripomastigotas.

Clone	Sequência do peptídeo	Padrão do peptídeo
TCT 01	M%\$#@ \$%##&N*&%@	X15
TCT 05	M%\$#@ \$%##&N*&%@	X15
TCT 07	%C\$#V&C@	XCX4CX
TCT 09	M%\$#@ \$%##&N*&%@	X15
TCT 11	&C\$#P@C%	XCX4CX
TCT 13	%\$&*##@ \$#G@DD0^	X15
TCT 15	%\$&*##@ \$#D@YV0^	X15

<b>MT 13</b>	<b>E@#%&amp;^%\$#*#%K</b>	X15
<b>MT 15</b>	<b>&amp;CW\$%^CL</b>	XCX4CX
<b>MT 17</b>	<b>\$C%\$#*CM</b>	XCX4CX

OBS: %\$^%&\*#@# são caracteres utilizados para ocultar aminoácidos nas sequências.

TCT 13 - %\$&£@#%£\$G@DD0^

TCT 15 - %\$&£@#%£\$D@YV5^

**Figura 10.** Sequência de dois peptídeos encontrados que apresentam 11 aminoácidos conservados, aqui demarcados nos trechos em cinza, tendo 86,36% de identidade. A porção conservada no início pode ser utilizada em construções futuras, pois parece ser importante para a ligação do peptídeo na superfície do parasito.

Cabe ressaltar que três clones (MT13, MT 15 e MT 17) selecionados por afinidade com formas tripomastigotas metacíclicas codificam peptídeos distintos. Apesar da identificação dos peptídeos mencionados acima, pretende-se ampliar o número de fagos sequenciados, pois na etapa de caracterização funcional, selecionaremos os peptídeos com características ideais de solubilidade para validação em ensaios *in vitro*.

Com os dois grupos de peptídeos identificados, os ligantes de MT e os ligantes de TCT partiremos para dois interesses de pesquisa. Primeiro: os peptídeos ligantes de MT tem potencial para manipulação da virulência de formas metacíclicas liberadas pelo inseto vetor, logo trabalhos posteriores validarão estes peptídeos para este fim. Já o segundo grupo de peptídeos pode nos fornecer pistas para prováveis proteínas do hospedeiro mamífero que interajam com a superfície de TCT. A fim de avaliar *in silico* esta possibilidade, foram realizadas pesquisas de homologia utilizando o algoritmo BlastP e o banco de dados de sequências de humanos.

Na análise de BlastP contra o banco de dados de proteínas de humanos (ALTSCHULT et al, 1997), pôde-se notar que há uma quantidade considerável de proteínas humanas que apresentam identidade com os peptídeos



encontrados. Contudo os “valores de e” (*e-value*) são muito baixos devido ao tamanho da sequência isca. Por exemplo, a sequência de TCT 13 apresenta identidade (88% e *e-value* de 131) com uma região Ship2 do domínio SH2 de inositol polifosfato 5- fosfatases de mamíferos, uma família de proteínas intimamente relacionadas com sinalização e interação celular (ERNEUX et al, 2011). Caso seja real, é possível que essas interações interfiram no curso da infecção (Figura 11A). Outro peptídeo, TCT 15, teve similaridade com proteínas ainda não bem descritas como a tetratricopeptídeo e outras ainda não nomeadas (Figura 11B). No entanto, ambos os peptídeos apresentaram semelhanças com a família proteica RAD51, recombinases que realizam o reparo de DNA em eucariotos, estando muito relacionadas com perda do controle de ciclo celular e tumorigênese em humanos (CHEN, 2015).

Considerando que as quatro bibliotecas de fagos utilizadas apresentam construções características (Tabela 4), foi possível observar também que os peptídeos selecionados e caracterizados no sequenciamento pertenciam a construções provenientes de 2 bibliotecas: LX4 e X15, o que demonstra uma preferência por tais padrões.

Chain B, Crystal Structure Of Human Ship2

Sequence ID: [pdb|3NR8|B](#) Length: 316 Number of Matches: 1

[▶ See 3 more title\(s\)](#)

[GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
21.4 bits(43)	131	7/8(88%)	7/8(87%)	1/8(12%)

PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 39A isoform X7 [Homo sapiens]

Sequence ID: [ref|XP\\_005270701.1|](#) Length: 574 Number of Matches: 1

[GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
23.1 bits(47)	33	7/11(64%)	7/11(63%)	0/11(0%)

unnamed protein product [Homo sapiens]

Sequence ID: [dbj|BAH12705.1|](#) Length: 550 Number of Matches: 1

[GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
23.1 bits(47)	33	7/11(64%)	7/11(63%)	0/11(0%)

**Figura 11.** Proteínas semelhantes aos peptídeos que interagem com os parasitos de cultivo em monocamada (TCT). **A:** Região do domínio da proteína SHIP2 que apresenta similaridade com o peptídeo TCT 13. **B:** Proteínas ainda não bem descritas que apresentam parte da sequência semelhante ao peptídeo TCT 15. Obtido e modificado do servidor NCBI BLAST em 12/12/2015.

**Tabela 4.** Estrutura dos peptídeos randômicos presentes na biblioteca de peptídeos. X representa que a posição pode apresentar qualquer um dos 20 aminoácidos e C representa a presença de uma Cisteína na posição.

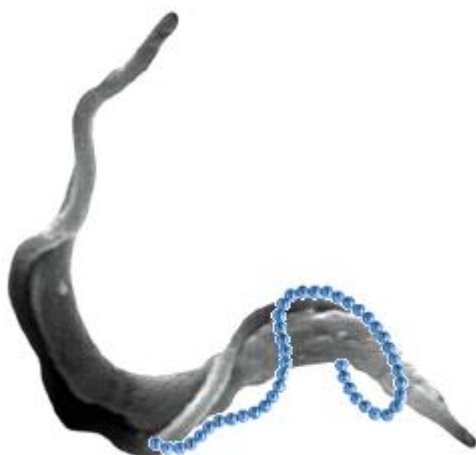
Nome	Sequência	Tamanho (aa)
<b>LX4</b>	XCXXXXCX	8
<b>LX8</b>	XXXXXXXXXXCX	12
<b>X8CX8</b>	XXXXXXXXXCXXXXXXXXX	17
<b>X15</b>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	15

## 8. PERSPECTIVAS

Apesar de demonstrar que a técnica de *Phage Display* é capaz de produzir resultados promissores, outros tipos de análises podem ser realizadas para otimizar os resultados. A utilização de uma biblioteca de peptídeos humanos é um modo ideal de dar continuidade a este trabalho, no sentido de identificar prováveis proteínas humanas que interajam com *T. cruzi*. O uso de uma biblioteca capaz de cobrir todo o peptoma humano permitiu encontrar auto-anticorpos envolvidos em doenças autoimunes para Larman e colaboradores (LARMAN et al, 2011).

Ampliar a determinação das sequências para permitir uma maior segurança em inferir quais regiões são críticas na interação, ou seja, uma maior número de sequências variantes de um mesmo peptídeo permitirá a obtenção de um padrão consenso. A partir dos variantes poderemos tentar identificar a proteína do hospedeiro mamífero e tentar utilizar ambos, o peptídeo derivado da biblioteca e o peptídeo equivalente da proteína humano no bloqueio da virulência.

Uma vez identificados e testados vários peptídeos no bloqueio da virulência, os peptídeos mais promissores, poderão ser construídos na forma quimérica (Figura 12) e ter sua funcionalidade avaliada.



**Figura 12.** Representação esquemática de um peptídeo (em azul) aderido a membrana do protozoário. Este peptídeo pode ser tanto apenas a porção ligante quanto um potenciador juntamente com o polipeptídeo lítico. Modificado de Tribuna Paraná Online, 2009.

Semelhante ao demonstrado na figura 12, os peptídeos com alta afinidade a MT serão expressos de diferentes formas no inseto barbeiro, por meio de bactérias do microbioma. Por exemplo, Durvasula et al desenvolveram um vetor para expressão estável de um peptídeo lítico para *T.cruzi*, a Cecropina A, a ser produzida na bactéria *Rhodococcus rhodnii*, um endossimbionte do triatomíneo *Rhodnius prolixus* (DURVASULA et al, 1997). As concentrações de Cecropina produzidas foram suficientes para eliminar o parasito do intestino do inseto e a bactéria mutada fica no organismo deste durante todo seu ciclo, além de ser capaz de passar para as próximas gerações (DURVASULA et al, 1999b).

Também é possível verificar se um peptídeo altamente aderente á membrana do parasito não seria capaz de aumentar o potencial do peptídeo lítico, uma vez que permitiria este último a ficar mais tempo em contato com seu alvo.

## 9. CONCLUSÕES

A semelhança dos peptídeos com proteínas humanas levam a formulações de diversas hipóteses, abrindo leques de possibilidades para novos estudos e, conseqüentemente, novas maneiras de combater ou interferir com a progressão da doença.

Um melhor conhecimento sobre quem interage com o protozoário é extremamente necessário para chegarmos a novas metodologias que consigam desacelerar ou parar a progressão da Doença de Chagas e o surgimento de novos casos. Neste contexto, a técnica de *Phage Display* contribui para a criação de tal conhecimento, por conseguir selecionar ligantes que possam ser utilizados como ferramentas prognósticas.

Embora ainda preliminar, este trabalho consegue demonstrar que a metodologia é eficiente e, se aprofundado, pode possibilitar a criação de uma ferramenta poderosa de controle vetorial.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.C.; Avaliação da Associação do Quimioterápico Benzonidazol a outros Fármacos com Ação Anti-T.cruzi no Tratamento da Doença de Chagas Experimental. **Dissertação** – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2013.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A.,ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J.; Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs. **Nucleic Acid Res.** 25(17):3389-402, 1997.
- ARGOLO, A.M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J.; Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. **Imperial Novo Milênio e Fundação Oswaldo Cruz.** 2008.
- BARRIAS, E.S., CARVALHO, T.M.U., DESOUSA, W.; *Trypanosoma cruzi*: Entry Into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Frontiers in Immunology.** Vol 4, Art 186. 2013.
- BONNYCASTLE, L.L.C.; MEHROKE, J.S.; RASHED, M.; GONG, X.; SCOTT, K.; Probing the Basis of Antibody Reactivity with a Panel of Constrained Peptide Libraries Displayed by Filamentous Phage. **J. Mol. Biol.** 258, 747-762, 1996.
- BRENNER, Z.; *Trypanosoma cruzi* – Morfologia e Ciclo Evolutivo. **Editora FIOCRUZ.** 25-31. 1997.
- BORGES, E.C.; Vetores da Doença de Chagas. **Laboratório de Triatomíneos.** Disponível em: [http://www.cpqrr.fiocruz.br/laboratorios/lab\\_triato/vetores%20da%20chagas.htm](http://www.cpqrr.fiocruz.br/laboratorios/lab_triato/vetores%20da%20chagas.htm), 1999.
- CARVALHO, T.U.; SOUZA, W.; Infectivity of Amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** 28(4) 205-212,1986.
- CEVALLOS, A.M.; HERNÁNDEZ, R.; Chagas' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission. **BioMed Research International.** Vol.2014: 1-10, 2014.
- CHAGAS, C.J.R.; Nova Tripanozomíase Americana, 1909.
- CHEN, J., MORRICAL, M.D., DONIGAN, K.A., WEIDHAAS, J.B., SWEASY, J.B., AVERILL, A.M., TOMCZAK, J.A., MORRICAL, S.W. Tumor Associated Mutations in a Conserved Structural Motif Alter Physical and Biochemical Properties of Human RAD51 Recombinase. **Nucleic Acids Res.** v.43(2); 2015.
- CHIARI, E; GALVÃO, L.M.C; Diagnóstico Parasitológico da Doença de Chagas. **Editora FIOCRUZ.** Pg 85-97, 1997.
- COURA, J.R.; The Main Scenarios of Chagas Disease Transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A Comprehensive Review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz.** Vol 110(3): 277-282, 2015.
- CORTEZ, C.; SOBREIRA, T.J.; MAEDA, F.Y.; YOSHIDA, N.; The gp82 Surface Molecule of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms. **Subcell Biochem.** Vol 74. pp137-150. 2014.
- DIAS, J.C.P.; Perspectivas de Controle da Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública.** 2(1): 84-103; 1986.
- DIAS, J.C.P.; Doença de Chagas e Transfusão de Sangue no Brasil: Vigilância e Desafios. **Revista Brasileira de Hematologia.** 28(2): 81-87, 2006.

- DIAS, J.C.P.; Globalização, Iniquidade, e Doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública.** , 23 Sup 1:S13-S22, 2007.
- DURVARSULA, R.V., GUMBS, A., PANACKAL, A., KRUGLOV, O., AKSOY, S., MERRIFIELD, R.B., RICHARDS, F.F., BEARD, C.B.; Prevention of Insect Borne Disease: An Approach Using Transgenic Symbiotic Bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 94:3274-3278, 1997.
- DURVARSULA, R.V., KROGER A., GOODWIN, M., PANACKAL, A., KRUGLOV, O., TANEJA, J., GUMBS, A., RICHARDS, F.F., BEARD, C.B., CORDON-ROSALES, C.; Strategy for Induction of Foreign Genes into Field Populations of Chagas Disease Vectors. **Annals of the Entomological Society of America.** 92:937-943, 1999b.
- ERNEUX, C., EDIMO, W.E., DENEUBORG, L., PIRSON, I.; SHIP2 Multiple Functions: A Balance Between a Negative Control of PtdIns (3,4,5)P3 Level, a Positive Control of PtdIns(3,4)P2 Production and Intrinsic Docking Properties. **Journal of Cellular Biochemistry.** 112: 2203-2209, 2011.
- FERRIÈRES, G., VILLARD, S., PUGNIÈRE, M., MANI, J.C., NAVARRO-TEULON, I., RHARBAOUI, F., LAUNE, D., LORET, E., PAU, B., GRANIER, C. Affinity for the Cognate Monoclonal Antibody of Synthetic Peptides Derived from Selection by Phage Display – Role of Sequences Flanking the Binding Motif. **Eur J Biochem.** 267(6): 1819-29. 2000.
- FERNANDES, M. C., FLANNERY, A. R., ANDREWS, N., MORTARA, R. A. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cell Microbiol.** V.15, p.977-91, 2013.
- FERREIRA, H.O.; Tratamento da Forma Indeterminada da Doença de Chagas com Nifurtimoz e Benzonidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 23(4): 209-211, 1990.
- FIGUEIREDO, I.M.; MARSAIOLI, A.J.; Mapeamento das Interações Proteína-Ligante através de Técnicas de RMN de <sup>1</sup>H Utilizando Detecção do Ligante. **Quim. Nova**, Vol.30, No. 7, pp1597-1605, 2007.
- GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, S.D.; JURBERG, J.; A Checklist of the Current Valid Species of the Subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and Their Geographical Distribution, with Nomenclatural and Taxonomic Notes. **Zootaxa.** 202 1:36, 2003.
- GHOSH, A.K., RIBOLLA, P.E.M., JACOBS-LORENA, M. Targeting *Plasmodium* Ligands on mosquito salivary glands and midgut with a *Phage Display* peptide library. **PNAS.** Vol. 98, no. 23, 13278-13281. 2001
- GOLEMIS, E.; protein-protein interactions : A molecular cloning manual. **Cold Spring Harbor**, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ix, 682, 2002.
- HELD, P. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience. **BioTek Instruments.** 2012.
- INGARAMO, M.; BECKETT, D.; Biotinilation, a Post Translational Modification Controlled by the Rate of Protein-Protein Association. **Journal of Biological Chemistry.** Vol. 286, No. 15, PP.13071-13078, 2011
- JORGE, T.A; Doença de Chagas. **Agência Fiocruz de Notícias.** Disponível em: <http://www.agencia.fiocruz.br/doença-de-chagas>, 2013
- JORGE, T.C.A.; CASTRO, S.L.; Parte I – Conceitos Atuais em Doença de Chagas Humana e Experimental. Vetores da Doença de Chagas e sua Relação com o Hospedeiro Vertebrado

- e o Parasita. **Editora FIOCRUZ**. 25-30, 2000.
- LOWMAN, H.B.; BASS, S.H.; SIMPSON, N.; WELLS, J.A.; Selecting High-Affinity Binding Protein by Monovalent Phage Display, 1991.
- MARKO, M.A., CHIPPERFIELD, R., BIRNBOIM, H.C.; A Procedure for the Large Scale Isolation of Highly Purified Plasmid DNA Using Alkaline Extraction and Binding to Glass Powder. **Anal. Biochem.** 121:382. 1982.
- NORRIS, K.A.; BRADT, B.; COOPER, N.R.; SO, M.; Characterization of a Trypanosoma cruzi C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J. Immunol.** vol. 147, no 7, pp.2240-2247, 1991.
- PAHO (Pan-American Health Organization); Map – Chagas Disease Vector Transmission. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&Itemid=&gid=27237&lang=pt](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=&gid=27237&lang=pt), 2014
- QUEIROZ, R.M.L.; Proteômica de Trypanosoma cruzi: Variações em Subproteomas Durante a Amastigogênese. **Tese** – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2013.
- RANGEL, R.; DOBROFF, A.; ROJAS, L.G.; SALMERON, C.C.; GELOVANI, J.G.; SIDMAN, R.L.; PASQUALINI, R.; ARAP, W.; Targeting Mammalian Organelles with Internalizing Phage (iPhage) Libraries. **Nature Protocols**. 10.1038, 2013.
- REY, L.; Parasitologia. **Guanabara Koogan**. 2ª edição. 1991.
- RUIZ, R. C.; RIGONI, V.R.; GONZALEZ, J.; YOSHIDA, N.; The 35/50 kDa surface antigen of Trypanosoma cruzi Metacyclic Tripomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. **Parasite Immunology**. Vol 15. Pp121-125, 1993.
- SCOTT, J.K.; SMITH, G.P.; Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. **Science**. 249:386 -390. 1990.
- SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. 228:1315-1317, 1985.
- SMITH, G.P.; Phage-Display Vectors and Libraries Based on Filamentous Phage Strain fd-tet. Disponível em: <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>, 2006.
- SMITH, G.P.; PETRENKO, V.A. Phage display. **Chem. Rev.** 97, 391–410, 1997.
- SMITH, J.; KONTERMANN, R.E.; EMBLETON, J.; KUMAR, S.; Antibody Phage Display Technologies with Special Reference to Angiogenesis. **The FASEB Journal**. 2005.
- SOUZA, W.; Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi. **Current Pharmaceutical Design**. 8, 269-28, 2002.
- STRASEN, J.; WILLIAMS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTE, O.; Epidemiology of Chagas Disease in Europe: Manu Calculations, Little Knowledge. **Clin. Res. Cardiol.** 103:1-10, 2014.
- TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P.H.; SOUZA, W.; Atlas Didático – Ciclo de Vida do Trypanosoma cruzi. **OpenLearn Works**. Disponível em: <http://www.open.edu/openlearnworks/course/view.php?id=1292>, 2013.



- TEIXEIRA, M.M.G.; YOSHIDA, N.; Stage-Specific Surface Antigens of Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* Identified by Monoclonal Antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 18 p. 271-282; 1986.
- VOLGELSTEIN, B., GILLESPIE, D., Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol 76, No.2, pp. 615-619. 1979.
- WEISSLEDER, R.; ROSS. B.D.; REHEMTULLA, A.; GAMBHIR, S.S.; Molecular Imaging – Principles and Practice. **PMPH-USA**, p. 663, 2010.
- WHO (World Health Organization). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact sheet n° 340, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, 2015.
- YOSHIDA, N.; Surface Antigens of Metacyclic Tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi*; **America Society for Microbiology**. Vol 40, n° 2, p. 836-839, 1983.
- YOSHIDA, N. et al. Metacyclic Neutralizing Effect of Monoclonal Antibody 10D8 Directed to the 35- and 50-kilodalton Surface Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, v. 57, n. 6, p. 1663-7, Jun 1989.
- ZHONG, G., SMITH, G.P., BERRY, J., BRUNHAM, R.C.; Conformational Mimicry of a Chlamydial Neutralization Epitope on Filamentous Phage. **The Journal of Biological Chemistry**. V.269, p 24183-24188, 1994.